ÉTUDE SUR LA COLORATION ET LA CULTURE DU BACILLE DE DUCREY

J. QUEYROT


22502573621

Mr E. Portal

Dr J. QUEYROT

ÉTUDE

SUR LA

COLORATION ET LA CULTURE DU BACILLE

DE DUCREY

Albert PERRELLON, imprimeur
Cours Gambetta, 32, Lyon

A mon excellent ami Dortal. Souvenir de nos bonnes relations toujours empreintes d'une bonne amitié. Puissions-nous un jour nous retrouver et continuer avec lui nos relations que mon départ a interrompues.

Dr [illegible]

ÉTUDE

SUR LA

Coloration et la Culture du Bacille

DE DUCREY

Dr J. QUEYROT

ÉTUDE

SUR LA

COLORATION ET LA CULTURE DU BACILLE

DE DUCREY

Albert Perrellon, imprimeur
Cours Gambetta, 32, Lyon

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

Je dédie ce modeste travail, faible témoignage de profonde affection et de sincère reconnaissance.

A MA GRAND'MÈRE

A MA SOEUR

A MON ONCLE

A MES PARENTS — A MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR GAILLETON

Professeur de clinique dermatologique
Grand Officier de la Légion d'honneur

A MONSIEUR LE DOCTEUR GANGOLPHE

Professeur à la Faculté de Médecine
Chirurgien-Major de l'Hôtel-Dieu

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. COURMONT

A MESSIEURS LES DOCTEURS CARLE ET MEYNET

INTRODUCTION

Jusque vers 1830, on a établi une confusion entre le chancre mou et le chancre syphilitique. On leur attribuait une origine commune, et c'est par une réaction spéciale de l'organisme sur le principe virulent que les syphiligraphes expliquaient la variabilité des modalités de la maladie qui, dans un cas, s'accompagnait d'accidents généraux, dans d'autres cas, se bornait à un accident local. C'est à la différence des constitutions, des tempéraments, des sexes, qu'ils attribuaient la différence des manifestations du virus. Admettant comme incontestable l'unicité de la cause, ils croyaient à l'identité de l'effet, et ne voyaient dans la variété des formes que l'influence des conditions individuelles.

Le chancre avait donc une graine unique qui produisait des fruits différents suivant l'organisme auquel il s'attaquait.

Dès 1815 déjà, on s'était élevé contre ces théories, mais c'est relativement de nos jours, avec Fournier et Diday, que la dualité des deux affections a été nettement établie. Le chancre mou est différent du chancre syphilitique, non seulement au point de vue de son absence

de réaction générale sur l'organisme, mais encore au point de vue de ses caractères cliniques : l'un est induré à bord peu nets, à fond rouge couleur chair musculaire, avec sécrétion peu abondante, l'autre a des bords anfractueux et soulevés, un fond grisâtre et sanieux, saigne facilement et sécrète un ichor purulent. Un examen clinique suffit donc à nous les faire distinguer. Pourtant dans quelques cas, il est fort difficile d'établir un diagnostic. Une ulcération étant donnée, on ne peut savoir si l'on a affaire à une ulcération syphilitique, une ulcération banale due à un traumatisme avec infection staphylococcique consécutive ou bien si l'on est en présence d'un chancre mou. Dans ces cas douteux, comment faire ? Le traitement varie, en effet, suivant que l'on a affaire à l'une ou l'autre de ces affections.

Depuis les travaux de Ducrey, en 1889, on sait que le chancre mou est dû à un bacille spécial, bacille de Ducrey, que l'on retrouve dans les sécrétions et dans les parois de l'ulcération. Ce bacille sur lequel de nombreuses études ont été faites depuis sa découverte ne pourrait-il pas, par ses caractères spéciaux, édifier un diagnostic hésitant ? On a déjà eu recours, dans ces cas difficiles, au procédé du raclage de Balzer et à l'inoculation. Le premier de ces moyens qui consiste à faire agir la potasse sur le produit que l'on a obtenu en raclant une ulcération chancreuse et voir si, après action du caustique, il demeure des fibres élastiques, n'est qu'un moyen grossier et peu sûr dans lequel on ne peut avoir confiance. L'inoculation encore assez souvent employée est évidemment un excellent moyen d'établir un diagnostic entre un chancre simple et un chancre

infectant. Mais en somme, jusqu'à quel point a-t-on le droit de réinoculer à un malade une affection sinon grave, du moins fort longue à guérir ? Ne serait-il point préférable, dans ces cas où la clinique ne peut donner une solution, d'examiner bactériologiquement le pus qui s'écoule de l'ulcération, ou les parois de l'ulcération elle-même, et au besoin, pour pousser plus loin le contrôle de faire des ensemencements ? Ce serait-là, croyons-nous, un moyen supérieur à ceux que nous avons cités plus haut.

Nous avons cru faire œuvre utile en réunissant et condensant dans un travail les différentes notions bactériologiques qui ont été données sur le bacille de Ducrey, et qu'on trouvait éparses dans de nombreux travaux. Nous nous occuperons surtout de la coloration et de la culture qui peuvent procurer un moyen d'affirmer un diagnostic qu'il serait souvent impossible de poser ferme si l'on s'en tenait à la seule clinique.

Nous diviserons notre travail en trois chapitres. Nous consacrerons le premier à l'historique de la question. Dans le second, nous traiterons des différents procédés de coloration qui ont été ou qui sont employés pour rechercher le bacille de Ducrey, soit dans le pus, soit dans le tissu chancreux lui-même. Enfin, le troisième chapitre sera réservé à l'étude des différents essais de cultures qui ont été faits et des résultats qu'ils ont donnés.

CHAPITRE PREMIER

Historique

Depuis des époques déjà fort reculées, on a soupçonné la présence dans le chancre mou d'un élément contagieux. De nombreuses théories furent émises sur ce sujet, théories d'abord purement fantaisistes ne reposant que sur des hypothèses vagues que ne contrôla aucune observation sérieuse. C'est ainsi que dès le XVIIe siècle Hauptmann, Calmet, Abercrombie, admettaient l'existence d'une espèce particulière d'insectes dans le chancre mou : « Je crois, disait Didier, que le virus vénérien n'est autre chose que de petits vers vivants qui produisent des œufs en s'accouplant, et qui peuvent aisément se multiplier comme font tous les insectes ».

Adams en 1795 proposa comme élément contagieux du chancre mou, un produit né de l'insecte mâle de la syphilis et du parasite femelle de la gale. A sa suite de nombreux auteurs décrivirent plusieurs éléments se rapprochant plus ou moins du genre Acar.

Plus tard Donné, en 1835, dit avoir découvert les éléments contagieux des affections vénériennes. Il décrivait pour chaque lésion des microorganismes spéciaux, éléments contagieux de l'affection, et qui exis-

taient dans le pus ou la sérosité. Le vibrio lineola était l'agent transmetteur du chancre mou.

Cet état d'ignorance sur la nature vraie du chancre mou, ces connaissances enfantines sur l'élément contagieux de l'affection ont persisté jusqu'à nos jours. L'avènement de l'ère bactériologique a eu raison de toutes ces théories fantaisistes jusqu'alors admises, et a montré que tous les parasites signalés n'étaient fort probablement que des détritus fibreux ou des amas de granulations.

En 1884, Leistikow (1), inaugure la série des travaux vraiment scientifiques. Il étudia le pus des productions chancrelleuses ; mais ses recherches furent vaines, il ne découvrit aucun parasite.

Straus, (2) la même année, publia un travail fort intéressant. Il avait essayé d'isoler l'élément contagieux du chancre mou ; et voulant éviter les nombreux microorganismes de l'air qui infectaient la surface du chancre, il s'adressa au pus du bubon non encore ouvert. Sur soixante cas environ qu'il examina, il trouva toujours le pus du bubon dépourvu de microbes. Ses tentatives de cultures faites dans des milieux variables solides ou liquides échouèrent constamment. Quand un développement se produisit à la surface du milieu ensemencé, il s'agissait d'organismes vulgaires dont l'inoculation demeura toujours sans succès.

En 1885, Ferrari de Catane (3), dans une communication à l'Académie Gioneia, décrivit un bacille plus

(1) Les numéros placés à côté des noms propres, renvoient à l'index bibliographique.

petit que celui de la tuberculose et de la lèpre se trouvant dans les globules de pus et les cellules épithéliales détruisant peu à peu le protoplasma et pénétrant jusqu'au noyau. Ce bacille facilement colorable par le violet de méthyle se trouvait également dans le pus des bubons. Il se pourrait que ce microbe décrit par Ferrari fût le même que celui de Ducrey et d'Unna, mais les caractères qu'il en a tracés ne sont ni assez nombreux ni assez affirmatifs ; la description en est incomplète, il ne parle pas de la forme caractéristique du bacille, s'il prend ou non le Gram, s'il pousse sur les milieux de culture ordinaires. Il insiste seulement sur la présence, sous forme d'amas, des bacilles dans les leucocytes. Mais ce n'est point là une propriété exclusive au bacille du chancre mou : les bacilles saprophytes de la peau, présentent souvent cette particularité. Il est probable que Ferrari aura vu ces deux bacilles sans les distinguer toutefois l'un de l'autre.

Mannino presque en même temps, décrivit dans le pus chancreux des bacilles droits ou curvilignes, mais pas plus que Ferrari il n'essaya de les cultiver.

En 1886 Luca, (4), dans un mémoire intitulé « El microcio dell'ulcera molle », donna la description d'un microorganisme de petite dimension se présentant en éléments isolés ou en zooglées, cultivable sur gélatine de viande, sur pomme de terre, sur le sérum de l'ascite, et qui inoculé reproduisait le chancre simple. Mais Campana qui a repris les expériences, n'a jamais obtenu que des cultures de staphylocoques ou de microbes pyogènes divers, et jamais les cultures obtenues inoculées en séries, n'ont reproduit un chancre typique.

En 1889 Ducrey, (5), donna la description d'un microbe constant dans le pus du chancre. Essayant de le cultiver par les moyens de culture ordinaires, il ne put arriver à aucun résultat. Il eut alors l'idée de l'ensemencer sur son terrain naturel, la peau de l'homme. Il inocula successivement plusieurs séries d'individus, et arriva à poursuivre ces pustules expérimentales jusqu'à la quinzième génération. Il obtenait à ce moment un pus ne donnant aucun développement dans les milieux de culture, et qui renfermait de nombreux bacilles courts, à extrémités arrondies, présentant en leur milieu un rétrécissement leur donnant l'apparence d'une navette. Il trouva aussi un microbe arrondi qu'il jugea être le même vu verticalement. Ce bacille se montrait par groupes de 4, 8 et plus, par couples ou isolé. Il se colorait par le violet de méthyle, le bleu de gentiane, mais ne prenait pas le Gram. Faisant des essais avec le pus de l'adénite chancreuse, il n'obtint aucun résultat ou seulement de fausses pustules dans lesquelles il ne retrouva pas le microorganisme. Il en conclut que l'adénite chancreuse était le résultat d'une inflammation banale, dépourvue de spécificité.

La question demeura deux ans en suspens. Ce n'est qu'en 1891 que Krefting (6), reprenant les expériences de Ducrey, obtint des pustules expérimentales sur 14 malades ; il publia ses résultats. Dans toutes les pustules résultant de ses inoculations il trouva constamment des bacilles identiques à ceux décrits par Ducrey. Il modifia le procédé de coloration adopté par son devancier. Mais les essais de culture du bacille demeurèrent infructueux.

En 1892, Gibert reprit les expériences de Roco de Luca. Il indiqua sa technique et les résultats qu'il avait obtenus. Il décrivit des microcoques se développant en colonies jaunes, mais l'auteur avait cultivé le staphylocoque doré, car par inoculation il obtint une vésicopustule à contenu jaunâtre entourée d'une auréole inflammatoire, et donnant l'apparence d'une vésicule banale d'inflammation.

La même année Jullien (7), voulant contrôler les expériences d'inoculation de Ducrey et Krefting, arriva à des résultats différents. Il ne put atteindre plus de trois générations, et remarqua que dans les pustules d'inoculation la sécrétion traitée par les colorants ordinaires ne contenait aucun microorganisme. Néanmoins, disait-il, ce pus est virulent puisqu'on peut obtenir une inoculation féconde. L'auteur concluait que l'organisme animé qui détermine le chancre existait assurément, mais qu'il était impossible à déceler par nos moyens actuels d'investigation. Quant à la perte de virulence des chancres d'inoculation dès la quatrième génération, il l'expliquait par l'absence de microorganismes étrangers que l'on trouve toujours dans des chancres infectés et qui formeraient avec le bacille du chancre simple une association microbienne nécessaire à l'activité de ce dernier bacille.

En 1892, Unna (8), envoyait à la Société de Dermatologie une note dans laquelle il disait avoir pu colorer dans les coupes de chancres mous un bacille qu'il considérait comme l'agent pathogène du chancre mou. Il se présentait sous forme de chaînettes de 2 à 5 anneaux. Il colorait par le bleu de méthylène et décolorait par le styrone.

Quinquand et M. Nicolle (9), arrivaient presque en même temps au même résultat par un procédé différent. La description qu'ils donnaient du bacille se rapprochait de celle d'Unna ; il se présentait en chaînettes longues et enroulées en dehors des cellules, et ne se colorait ni par le Gram ni par le Khüne.

Krefting (10), en 1892, établit l'identité des deux microbes décrits par Ducrey et par Unna. Il a rencontré le bacille dans les espaces lymphatiques comme Unna et dans les cellules de pus comme Ducrey. Il l'a vu sous forme de chaînettes et sous forme d'éléments isolés à extrémités arrondies et rétréci en son milieu. Il attribua les différences de description aux milieux différents, pus et tissus dans lesquels Ducrey et Unna dirigèrent leurs recherches. Les assertions de Krefting furent entièrement confirmées par les travaux d'Audry (11), en 1893.

Unna d'ailleurs dans une revue vénéorologique d'Italie (septembre 1895), se range à l'avis de Krefting et d'Audry et conclut à l'identité de son strepto-bacille et du bacille de Ducrey.

« Les légères différences de forme et de dimensions, dit-il, tiennent à ce que le bacille est à une phase différente de son développement dans les tissus et dans le pus ».

M. Lenglet, dans un mémoire paru en 1901, ajoute à la longue série des travaux publiés jusqu'à ce jour de nouveaux détails importants sur le mode de groupement des bacilles et leur reproduction.

Toutefois jusqu'à ces dernières années les essais de cultures étaient restés négatifs. Tous les auteurs qui s'étaient occupés de la question bactériologique du chancre mou avaient vainement dirigé leurs recherches de

ce côté. Nous ne ferons que signaler ici les essais infructueux de Krefting, Petersen, Marchal de Calvi. Nous reparlerons de leurs tentatives au chapitre de la culture du bacille. L'année dernière MM. Bezançon, Griffon et le Sourd et M. Lenglet ont atteint par des voies différentes le but poursuivi depuis si longtemps. Ils sont parvenus à obtenir des cultures pures de bacilles de Ducrey. Ils contrôlèrent leurs expériences en essayant d'inoculer ces cultures. Le résultat fut positif et ils obtinrent des chancres mous typiques qu'ils purent réinoculer en séries, ainsi que l'attestent les observations ajoutées à leur mémoire. Ces derniers travaux sont les plus importants sur la question puisque ce sont les seuls qui soient arrivés à la preuve convaincante de la spécificité du bacille :

1° Par les cultures pures.

2° Par la reproduction de la lésion par inoculation.

CHAPITRE II

Coloration et Recherche du Bacille

Nous savons par les travaux de Ducrey et d'Unna que le bacille du chancre simple existe dans deux milieux : le pus où le premier de ces auteurs le trouva et le décrivit, et le tissu même du chancre dans lequel Unna pour la première fois parvint à le colorer. Les moyens de recherches varieront évidemment suivant le milieu dans lequel on recherche ce bacille. D'où une division toute naturelle de ce chapitre en deux paragraphes :

Coloration et Recherche du bacille dans le pus du chancre.

Coloration et Recherche du même bacille dans le tissu du chancre.

Nous envisagerons tour à tour l'un et l'autre point de vue, et donnerons les différentes méthodes qui ont été proposées pour rechercher le bacille dans ces deux milieux.

Mais auparavant, croyons-nous, il ne serait point inutile de consacrer quelques lignes à la morphologie du bacille et à son mode de groupement. Tous les auteurs

sont d'accord sur sa forme caractéristique ; court, épais, aux extrémités légérement arrondies muni d'une dépression latérale qui lui donne la forme d'une navette. Sa longueur varie de 1, 3 à 2 μ. Il est le plus souvent isolé, mais on trouve pourtant dans une préparation quelques bacilles réunis bout à bout, ce qui leur donne l'apparence d'un chapelet constitué par 4, 5 ou 6 éléments, quelquefois davantage 10, 12 et plus. Chaque élément offre exactement les caractères du bacille isolé.

Il est un autre mode de groupement plus fréquent que la réunion en chaînettes ; c'est le groupement en amas. En divers points de la préparation, tantôt dans un leucocyte, tantôt et le plus souvent en dehors, on rencontre des amas de bacilles très rapprochés les uns des autres. Quelques-uns se réunissent bout à bout dans ce groupement d'individus isolés et forment une chaînette.

Pour M. Lenglet (14) (Ann. de dermat. et de syph. Mars 1901), la formation de ces amas est un mode de colonisation du bacille. Et en effet, dit M. Lenglet, si on fixe par du sublimé acétique un chancre jeune excisé provenant de cultures pures, on ne trouve presque que des amas de ces bacilles disposés sans ordre. Le phénomène est, parait-il, encore plus probant si l'on examine ce qui se passe dans une série de cultures et d'inoculations à l'homme avec le même bacille. Un bacille en chaînettes dans le pus poussera en chaînes dans les tubes de cultures, puis après une série d'inoculations et de cultures, on ne trouvera plus que quelques rares vestiges des chaînettes primitives ; tous les bacilles seront en amas.

Un fait plus curieux et décrit pour la première fois par M. Lenglet dans le mémoire cité plus haut, est la présence autour des éléments, qu'ils soient isolés, en amas ou en chaînettes, d'une substance unissante qui les enveloppe. Cette substance peu apparente à l'état normal, apparait bien quand le bacille est inclus dans un leucocyte ; on voit alors le bacille rouge séparé du leucocyte rose par une trainée incolore qui représente cette substance. Cette " substance glaireuse " ne se voit pas à l'état normal, mais apparait dans les cultures sous certaines conditions. Quand la culture a souffert par exemple, les bacilles peuvent s'allonger et prendre une longueur inusitée, ou bien au contraire, diminuer de longueur ressemblant à de fins streptocoques très rapprochés les uns des autres ou notablement éloignés ; et dans ce dernier cas alors on voit la substance interbacillaire colorée moins vivement que le bacille, trancher avec celui-ci, dont le rouge foncé marque comme autant de jalons dans la trainée rose de la substance unissante. Cette matière glaireuse aurait une importance considérable dans l'existence du bacille ; les formes où la matière péribacillaire est abondante, opposeraient une grande résistance à la disjonction. Ce serait probablement là l'explication des différences de groupement dont nous avons parlé plus haut.

Nous allons maintenant aborder l'étude de la recherche et de la coloration du bacille de Ducrey dans les deux milieux où on le rencontre. Nous commencerons par le pus chancreux.

Technique a suivre pour l'étude du bacille dans le pus chancreux.— Il est tout d'abord indispensable pour

cette étude, d'avoir à sa disposition des lames propres. Pour arriver à ce résultat, on peut les plonger dans une solution d'acide sulfurique dilué à 10 ou 20 pour cent. On lave ensuite à l'eau courante pour chasser l'acide et on place les lames et les lamelles dans l'alcool absolu. On les retire de ce bain au fur et à mesure des besoins. On les passe alors à la flamme d'une lampe à alcool. Elles sont aptes dès lors à recevoir sur leur surface le liquide qu'on destine à l'examen microscopique.

Si c'est du pus que l'on veut examiner, il n'est point indifférent de le prendre d'une façon ou d'une autre. La surface ulcérée du chancre peut, en effet, être souillée par les différents contacts. Il en résulte alors dans le pus, la présence d'éléments figurés nouveaux qui gênent les recherches en encombrant la préparation. Le pus chancreux est relativement pauvre en bactéries spécifiques, riche, au contraire, en bactéries banales. Il faut autant que possible se débarrasser de ces dernières. Pour ce faire, il faut, après avoir essuyé la sérosité du chancre avec un morceau de coton, laver l'ulcération avec des liquides antiseptiques, puis gratter légèrement tout en évitant de faire saigner. C'est là le point délicat de l'opération. Les parois du chancre sont, en effet, très riches en capillaires, et une légère hémorrhagie mélangerait avec le pus une certaine quantité de sang dont la fibrine se coagulant sur la plaque, gênerait la coloration. On pourrait encore, après avoir lavé la surface chancrelleuse avec des liquides antiseptiques, la recouvrir d'un pansement aseptique et occlusif, puis, au bout de deux jours, prendre le pus secrété au

dessous de cette pellicule ; il sera à peu près débarrassé des bactéries étrangères. On prend donc avec soin une goutte de pus du chancre, on la dépose sur une lame qu'on recouvre d'une lamelle ; la goutte de pus s'étale sous la pression de la lamelle. Il ne faudrait point frotter les lames l'une contre l'autre, opération qui pourrait casser les chaînettes des bacilles. Les lames ainsi préparées sont mises à sécher à la température du laboratoire, sans jamais essayer de les sécher à la lampe. Puis on fixe sans tarder.

On peut se servir pour cette opération de différents procédés dont le plus simple consiste à passer trois ou quatre fois la lame sur la flamme d'une lampe à alcool, ou la plonger dans un mélange d'alcool-éther qu'on laisse ensuite évaporer, ou encore comme fait Ch. Nicolle, on peut se servir du sublimé (liqueur de Mayer additionnée d'eau). On y plonge les lames un instant, puis on les lave à grande eau pour les débarrasser de toute trace de sublimé. Les lames sont alors prêtes pour la coloration.

Comment colorera-t-on le bacille de Ducrey ? De nombreuses méthodes ont été proposées, les unes à simple coloration, les autres par double coloration basées sur ce principe que le bacille du chancre mou ne prend pas le Gram. Ce bacille a la propriété d'absorber très facilement les différents colorants dont on se sert en bactériologie, et n'importe quelle couleur pourra nous conduire à un résultat. Aussi ne donnerons-nous pas la liste de toutes les méthodes qui ont été ou peuvent être employées ; nous nous contenterons de citer les plus usitées et les plus pratiques.

Coloration par le violet de gentiane. — C'est la méthode à laquelle eut recours Ducrey dans ses études sur le bacille qui porte son nom. On se sert de la solution ordinaire qu'on fait agir quelques secondes sur la lame ; on lave à grande eau et on examine soit dans l'eau, soit dans le baume. On voit les bacilles de Ducrey bien colorés aux deux extrémités, clairs au centre, se différenciant assez nettement des autres éléments du pus.

Coloration par le bleu de Khüne. — On se sert d'une solution phéniquée contenant une petite quantité de bleu. On laisse agir une ou deux minutes ce réactif ; le bacille se colore en bleu foncé. Cette méthode offre toutefois le désavantage de ne donner qu'une coloration peu tenace au bacille. Aussi est-il bon de fixer la préparation par une solution de tannin à 1/10.

Coloration par le bleu de méthylène additionné de borax. — C'est là une solution recommandée par Cœsar Bœck pour l'étude des champignons. Elle fut suivie par Krefting dans ses études sur le bacille du chancre mou. Elle est composée de la façon suivante ;

Solution de borax à 5 o/o.	16 gr.
Solut. aq. saturée de bleu de méthyle.	20 gr.
Eau distillée	24 gr.

Coloration par la fuchsine de Ziehl. — Diluée au 1/20e, cette solution sert souvent de colorant du bacille. C'est le procédé dont se sert M. Lenglet. Voici comment il opère : Il étale sur une lame le pus chancreux sans faire de pression ; puis il fixe la préparation en la passant plusieurs fois au-dessus de la flamme d'une lampe à alcool. Il verse ensuite sur la préparation quelques gouttes d'alcool-éther qu'il laisse évaporer. Il colore à

ce moment en laissant agir cinq heures la fuchsine sur la lame ; puis il lave à grande eau et enfin à l'alcool absolu. Il sèche la préparation et la monte dans le baume ; les bacilles sont colorés en rouge clair.

On peut encorer employer le bleu de toluidine qui donne une coloration intense au bacille. On l'utilise en solution aqueuse ou phéniquée à 0,05 o/o.

L'hématoxyline acétique, procédé peu pratique, ne donne aux bacilles qu'une coloration très pâle après un contact même très prolongé. L'oxychlorure de ruthénium offre les mêmes inconvénients.

Toutes ces méthodes à une seule coloration offrent un désavantage commun : elles colorent uniformément la préparation, et il est souvent fort difficile de pouvoir distinguer l'élément que l'on recherche, le bacille spécifique, des nombreux microbes qui l'accompagnent.

Méthode de Gram. — Aussi la méthode de Gram est-elle de beaucoup préférable, et si elle est plus délicate que les autres, elle nous confère tout au moins une plus grande certitude au point de vue du diagnostic. La technique générale ne diffère en rien de la technique suivie pour les autres microbes. On laisse la préparation quelques secondes en contact avec la solution de violet de gentiane aniliné étendue de son volume d'eau. On lave à grande eau, puis on plonge la lame dans le liquide de Gram pendant une demi-minute environ ; on décolore ensuite par l'alcool. Le bacille de Ducrey est entièrement décoloré. On ne voit sur la préparation que les bactéries et les cocci restés violets. On recolore ensuite le bacille de Ducrey avec un colorant quelconque.

Procédé de Gram-Nicolle. — A cette technique générale

du procédé de coloration par le Gram, on a fait quelques modifications. Dans le procédé Gram-Nicolle, la préparation colorée par le violet de gentiane phéniquée est soumise pendant une minute environ à l'action de la solution de Lugol qui fixe le colorant sur les bacilles qui prennent le Gram. Puis après avoir lavé à grande eau, on décolore par l'alcool-acétone. Quand le liquide s'écoule clair, le bacille est décoloré. On le recolore alors par la safranine ou par une solution de fuchsine phéniquée. Mais ce dernier colorant communique une teinte trop foncée aux bacilles.

Tels sont les procédés de coloration du bacille dans le pus chancreux auxquels on peut avoir recours. Nous n'avons cité que les plus simples et les plus employés mais on pourrait augmenter leur nombre presque indéfiniment en faisant appel à tous les colorants dont on se sert en bactériologie. Mais, en somme, de cette longue liste de procédés que nous avons énumérés, la méthode de Gram est celle qui donne les meilleurs résultats. Les autres procédés communiquent une coloration trop faible au bacille que l'on distingue à peine des éléments nombreux au milieu desquels il se trouve, et surtout colorant uniformément tous les éléments de la lame, il faut une certaine habitude pour retrouver le bacille spécifique au milieu de ce fouillis. La méthode de Gram, un peu plus délicate il est vrai, donne au diagnostic une plus grande fermeté.

Coloration du bacille de Ducrey dans le tissu du chancre. — Unna, le premier, en 1892, parvint à découvrir et colorer dans les coupes le bacille spécifique du chancre mou. Nous allons décrire la méthode qu'il a

suivie dans ses expériences. Après avoir durci ses pièces dans l'alcool absolu, il faisait des coupes qu'il colorait par une solution de bleu de méthylène très alcaline. Ayant coloré ses coupes, il les lavait et les séchait au papier buvard, puis les décolorait par l'éther glycérique. Les séchant de nouveau avec du buvard, il déshydratait par l'alcool absolu et l'essence de bergamote puis montait dans le baume. Par cette méthode il parvint à mettre en évidence le bacille du chancre mou. Il donna une description détaillée de sa morphologie, de ses différences dans les chancres jeunes ou vieux, de ses modes de groupement, de l'influence que les traitements exercent sur lui. Sa description s'éloignait sensiblement de celle qu'avait faite Ducrey, et il crut tout d'abord avoir décrit un agent contagieux différent de celui reconnu jusqu'alors comme tel. Mais dans une communication à la société de dermatologie et de syphiligraphie il reconnut l'identité des deux microbes et attribua leurs différences légères au milieu dissemblable dans lequel ils avaient été puisés. Le grand tort de sa méthode était de ne conférer qu'une coloration très pâle aux bacilles.

Aussi voyant cet inconvénient la même année MM. Quinquand et Maurice Nicolle modifiant le procédé d'Unna, montraient à la société de dermatologie des coupes beaucoup plus colorées. Leur méthode consistait à colorer par le bleu de Khüne, déshydrater par un mélange de xylol et d'huile d'alinine, procédé qui a l'avantage de décolorer très peu les bacilles pendant la déshydratation. Krefting se servant de cette méthode légèrement modifiée, découvrit le premier la présence des bacilles dans les cellules du chancre.

Toutefois cette méthode, quoique supérieure à celle d'Unna, n'est pas absolument sûre, et les bacilles ne sont pas toujours très nets et très visibles sur la préparation. En 1893, Maurice Nicolle publia dans les annales de l'Institut Pasteur sa méthode de coloration pour les bacilles ne prenant point le Gram. Elle consiste à faire agir sur la coupe colorée une solution de tannin au 1/10e qui rend la coloration insoluble ; la déshydratation ne décolore aucun bacille. Essayée sur le bacille du chancre mou elle donna des succès.

Rivière (16) après avoir critiqué dans une communication à la société d'anatomie et de physiologie de Bordeaux, les méthodes de ses devanciers, propose la méthode suivante : fixer les pièces par l'alcool acétique, mettre une heure dans l'alcool absolu puis dans le chloroforme, enfin dans la parafine. Après avoir collé ses coupes il les colore par une solution alcaline et alcoolisée de bleu de méthylène, puis décolore par une solution contenant deux gouttes de fluoresceine, dans l'alcool absolu. Il lave ensuite à grande eau. C'est encore là une méthode fort délicate et ne donnant aux bacilles qu'une coloration peu intense.

Petersen (17), en 1893, publie ses recherches personnelles sur le pus de l'ulcération chancreuse et sur ses essais de cultures. Il n'emploie pas la méthode au tannin, l'accusant d'être infidèle, et conseille de déshydrater par insufflation simple au lieu de faire agir l'alcool absolu.

Procédé de Ch. Nicolle. — Ch. Nicolle, dans sa thèse de 1893, donne le procédé qu'il a suivi pour colorer le

bacille dans le tissu du chancre. Après avoir enlevé soigneusement le chancre, il le fixe par une solution de sublimé à 3. 50 p. o/o, dans lequel il laisse plusieurs heures la préparation. Puis, il lave à grande eau, de manière à chasser tout le sublimé et les précipités albumino-mercuriques de la préparation. Après quoi, il inclut la préparation dans la parafine. Il déshydrate auparavant, non point par l'alcool qui durcit trop la préparation, mais par l'acétone dans lequel il la laisse 48 heures environ. Au sortir de ce bain, les pièces sont placées dans l'éther ou le xylol, où elles séjournent 24 heures. Après quoi, elles sont soumises à l'étuve à 55°, dans un bain de parafine ou de xylol pendant 48 heures, puis 24 heures dans la parafine pure.

On peut alors obtenir des coupes très fines au 300e ou 400e avec le microtome à bascule. Il colle ces coupes si elles sont trop fines, puis les soumet à la coloration. Il a employé plusieurs méthodes, entre autres, la méthode du bleu de méthylène phéniqué et du tannin. Malgré les assertions de Petersen, il assure ne jamais avoir eu à se plaindre des phénomènes de l'action du tannin. Les insuccès, croit-il, étaient peut-être dus à la mauvaise qualité du tannin. Toutefois, le bleu de méthylène ne confère qu'une pâle coloration aux bacilles, aussi lui préfère-t-il le bleu de toluidine. On pourrait encore employer une solution de thionine.

Nous connaissons maintenant la morphologie du bacille de Ducrey et les différentes manières de le colorer, soit dans le pus, soit dans le tissu du chancre ; mais, avons-nous dit, sur une préparation, il ne se présente jamais seul, mais, bien au contraire, isolé au milieu d'une

quantité d'éléments divers dont quelques uns offrent avec lui de grands traits de ressemblance.

Ce seront d'abord des cocci que l'on rencontre d'ordinaire en assez grand nombre. Ils se présentent sous la forme d'individus isolés, ronds ; quelquefois, ils sont en train de se diviser et ils affectent alors la figure de deux haricots se regardant par leur face concave, laissant entre eux un espace elliptique qu'on peut prendre pour l'espace clair du bacille de Ducrey. Ils se colorent avec intensité par le violet de gentiane, la fuchsine de Ziehl, mais ils ne perdent point leur coloration après action du Gram. Cette particularité suffira à les faire distinguer du bacille du chancre mou.

Certains diplocoques pourront aussi prêter à confusion et donneront l'illusion d'un bacille de Ducrey mal coloré dont les deux extrêmités seulement auraient pris le colorant.

On rencontrera aussi un microorganisme à forme bacillaire, la bactérie commune de la peau, décrite par Nicolle. Cette bactérie vit à la surface de la peau et se trouve constamment sur toutes les ulcérations, sur toutes les pustules cutanées. C'est un bacille allongé, isolé, à bouts arrondis, quelquefois très court, d'autres fois extrêmement long. Souvent il se présente sous la forme d'un diplo-bacille composé de deux éléments semblables séparés par un petit espace linéaire, mais jamais il ne forme de véritables chaînettes. Ce qui le distingue avant tout du bacille de Ducrey, c'est la façon de prendre les colorants qui lui communiquent tous rapidement une teinte uniforme et intense. De plus, il ne se décolore pas par le Gram.

Enfin, dans quelques rares cas, on pourra trouver le gonocoque ou d'autres bacilles comme le staphylocoque, le streptocoque.

A côté des microorganismes divers que l'on rencontre auprès du bacille de Ducrey, on voit des éléments cellulaires, des filaments de fibrine qui s'enchevêtrent au milieu de la préparation, des globules rouges, des lymphocytes, des éléments élastiques et des débris cellulaires divers provenant de leucocytes morts ou d'éléments de tissus désagrégés par le processus chancreux.

Tels sont, à peu près, tous les éléments que l'on pourra trouver au milieu d'une préparation. Quelques-uns d'entre eux pourront prêter à confusion et donner l'illusion du bacille de Ducrey. Il suffira d'un peu d'habitude et d'attention pour échapper à ces causes d'erreurs.

CHAPITRE III

Culture du Bacille de Ducrey

Pendant longtemps toutes les tentatives faites pour cultiver le bacille de Ducrey restèrent vaines. Les expérimentateurs n'obtinrent jamais comme résultat de leurs ensemencements que des cultures de staphylocoques, ou de microbes divers qui se développaient sur l'ulcération, mais jamais l'inoculation d'une de ces cultures n'avait reproduit le chancre. Il serait trop long de relater toute la série des auteurs qui ont dirigé leurs efforts sans résultats de ce côté. Nous nous contenterons de parler des premiers essais infructueux de Ducrey, de Petersen, de Krefting, de Nicolle, de Maréchal et enfin des publications de MM. Lenglet et Bezançon, Griffon et Le Sourd qui sont parvenus, il y a peu de temps, à résoudre le problème de la culture demeuré si longtemps sans solution.

En 1889, en même temps qu'il donnait la première description du bacille spécifique du chancre mou, Ducrey essaya de cultiver son microbe sur les milieux dont il

disposait alors. Il tâcha d'abord de l'isoler des bactéries étrangères qui l'accompagnent toujours au niveau de l'ulcération chancreuse, et, pour cela, il fit plusieurs séries d'inoculations qui lui donnèrent en dernier lieu une surface presque exclusivement envahie par le bacille spécifique. Il essaya alors, sans jamais obtenir de résultats positifs, de cultiver son bacille sur le bouillon de bœuf simple ou peptonisé alcalin, neutre ou acide, le bouillon de poulet, la gélatine, l'agar, le lait, l'urine diabétique, la pomme de terre, les œufs, en un mot sur tous les milieux dont il disposait en son temps. Il fit des cultures aérobies et anaérobies à des températures variables. Aucun succès ne vint couronner ses efforts.

Petersen, quelques années plus tard, reprenant la question, prétendit avoir obtenu sur l'agar serum une culture dont les éléments primordiaux ressemblaient au bacille de Ducrey. Inoculant ces cultures à l'homme, il aurait obtenu une petite pustule qui aurait guéri spontanément. Mais il n'a nullement contrôlé son observation par une réinoculation de ce pus, et de plus, il est rare en clinique de voir un chancre guérir spontanément en cinq jours. Il faut donc mettre en doute la valeur de ces résultats.

Nicolle, après avoir répété inutilement les tentatives de Ducrey sur bouillon, agar, gélatine, lait, pomme de terre, essaie l'agar à 0,5 o/o, le serum liquide, le serum de pomme de terre, les gouttes suspendues de pus chancreux avec ou non addition de serum ou d'humeur aqueuse, mais toujours sans succès.

Maréchal, en 1897, prétendit avoir obtenu des cultures du strepto-bacille par ensemencement dans du liquide

d'ascite. Il fit part de ses travaux à la Société de Dermatologie, mais en somme, il fallait avoir la plus grande réserve sur ces résultats qui n'avaient point été contrôlés. M. Maréchal n'avait point essayé, en effet, d'inoculer ses cultures et de donner ainsi la preuve de la valeur de ses travaux.

La même année, MM. Istamanoff et Akspiantz (18) publiaient dans la Société médicale du Caucase un article sur le bacille du chancre mou. Ils disaient avoir réussi à le cultiver en employant de la gélose obtenue par macération de peau humaine. L'inoculation de ces cultures aurait donné un résultat positif.

M. Lenglet, en 1897, a présenté à la Société de Dermatologie des cultures pures de l'agent pathogène du chancre mou. Il donnait les preuves de la réalité de ses assertions. En effet, il était arrivé à obtenir des cultures pures et toujours semblables en partant de malades différents ; faisant des cultures de réensemencement, il les inocula à l'homme. Les résultats furent positifs. On retrouvait toujours le bacille dans le pus de ces chancres d'inoculation. La preuve était donc certaine et irréfutable. Il donnait la description de la morphologie de ces cultures et de leur élément primordial.

On fit un reproche à M. Lenglet de ne point avoir donné à ce moment-là la technique qu'il avait employée pour arriver à ses résultats et la formule du milieu dont il s'était servi.

MM. Bezançon, Griffon et Le Sourd (19), dans un travail qu'ils ont présenté au mois de janvier 1901 à la Société de Dermatologie, publient les résultats qu'ils ont obtenus dans la culture du bacille spécifique de la

chancrelle. Se basant sur des recherches qu'ils avaient faites en 1900 sur certains microbes pathogènes pour l'homme qui ne poussent pas dans les milieux usuels, mais se développent bien, si on les ensemence dans un milieu où rentre du sang non modifié, ils appliquèrent cette méthode au bacille de Ducrey.

Le milieu dont ils se sont servis est le sang gélosé, milieu solide qui permet de prélever des cultures à sa surface et d'isoler ainsi des ferments à l'état de pureté. Ils obtiennent ce milieu en mélangeant du sang à de la gélose liquéfiée par l'autoclave dans la proportion de 1 pour 2. Ils empruntent le sang à l'homme, au chien ou au lapin ; mais c'est à ce dernier animal qu'ils eurent surtout recours. Après avoir dénudé la carotide, ils y enfonçaient un trocart et recueillaient le sang dans des vases de gélose chauffée au bain-marie à 50° ; ils agitaient afin d'obtenir un mélange intime des deux substances, puis les abandonnaient à sa solidification.

Ils eurent recours pour ensemencer leur milieu au chancre mou et au bubon suppuré mais non ouvert. Dans ce dernier cas, il suffit d'asceptiser la peau et de pratiquer une légère incision à l'endroit où la suppuration est le plus manifeste, puis de plonger une pipette et d'aspirer le pus. L'ensemencement sur les tubes doit être immédiat et abondant. Les tubes sont ensuite portés à l'étuve à 37°.

S'il s'agit d'une ulcération chancrelleuse, il est évident qu'on ne peut d'emblée avoir des cultures pures du microbe. Le staphylocoque et la bactérie de la peau pullulent et risquent dans un ensemencement d'envahir le milieu de leurs colonies exubérantes. Il vaut mieux, en partant

du chancre primitif, faire un chancre d'inoculation et prendre soin de recueillir le contenu de la pustule avant que celle-ci ne soit rompue. Toutefois dans les régions où la désinfection est facile (abdomen-aîne), on peut désinfecter le chancre, l'aseptiser en quelque sorte par des solutions antiseptiques, puis maintenir sur sa surface un pansement antiseptique. La cuticule se reforme et l'on peut y puiser au bout de deux ou trois jours le pus nécessaire à l'ensemencement d'un tube.

Au lieu de sang gelosé, on peut se servir du sérum non coagulé de lapin, milieu que l'on pourra utiliser quand on a affaire à un milieu chancrelleux pur de tout autre bacille que le strepto-bacille.

Telle est la technique opératoire qu'ont suivie MM. Bezançon, Griffon et Le Sourd. Les résultats qu'ils ont obtenus ont été en tous points positifs ; les inoculations de leurs cultures ont toujours réussi ainsi que l'attestent leurs observations cliniques.

M. Lenglet, dans une publication du mois de mars 1901, donne la formule du milieu de culture qu'il a employé pour les recherches dont il avait déjà donné le résultat en 1898. Il n'avait alors émis que des idées très générales sur la nature du milieu qu'il croyait préférable. Il avait recherché, disait-il, alors un élément suffisamment rapproché du milieu alimentaire normal où vivait le microbe, et pour arriver à ce résultat, il avait soumis les éléments proteiques de la peau de l'homme à l'action de certains ferments.

Telle était laconiquement exprimée la seule indication qu'il donnait du milieu de culture auquel il aurait eu

recours. Dans sa récente publication, il donne tous les détails de la technique.

Se basant sur ce fait que le bacille de Ducrey atteint surtout les régions cutaneo-muqueuses, il essaye d'humaniser son milieu de culture et prend après asepsie de la région, la peau de la cuisse, du bras et de l'abdomen sur des cadavres frais. Divisant cette peau mécaniquement il l'introduit dans des ballons ou des tubes en présence d'un bouillon de pepsine ou de pancréatine et soumet le tout à la chaleur. C'est en somme une véritable digestion qu'il opère. Quelle technique suit-il pour éviter les chances d'infection ? Comment opère-t-il ? Quelle quantité de peptone obtient-il ? Nous allons examiner ces divers points. Tout d'abord, conseille M. Lenglet, il faut opérer sur de petites quantités de peau qui rendent les manipulations plus faciles, et qui évitent une perte totale de la matière première si les tubes viennent à s'infecter. Prenant donc de longs tubes étroits, il introduit 20 grammes de peau, 50 cent. cubes d'eau distillée et 1 gramme de pepsine ou de pancréatine qui doit être toujours la même pour avoir des résultats toujours identiques. Il introduit quelques gouttes d'acide chlorhydrique et soumet le tout au chauffage. Il faut ici éviter deux écueils ; trop chauffer, ce qui arrête l'action des ferments solubles, coagule les albumines et rend le milieu impropre aux expériences, ou pas assez chauffer, ce qui permet aux microbes de pulluler. Il donne comme chaleur optima les températures comprises entre 45° et 55°. Les ferments résistent bien à ces températures qui aidées par les phénomènes de digestion, sont suffisantes pour arrêter le développement microbien.

Pourtant la température variera avec les différentes pepsines que l'on aura utilisées ; c'est pourquoi avant toute expérience il faudra s'assurer de la résistance et de l'activité de la pepsine. Il faut laisser continuer la digestion jusqu'à ce que la lame cornée de l'épiderme persiste seule et vienne flotter à la surface du tube. On déduira cette quantité de résidus inutilisés du chiffre de matière première introduite dans le tube, pour avoir le poids approximatif de peptones obtenues qu'on n'aura plus qu'à verser dans les différents milieux de gélose préparés. Il faut avoir soin auparavant de chauffer à 80° ces peptones, afin de les débarrasser de tout ferment actif qui pourrait gêner les résultats. On verse donc deux ou trois grammes de peptone dans de la gélose bien humidifiée ; on arrose de 1 cent. cube de sang la surface du milieu qui est alors prêt pour l'ensemencement.

Suivant cette technique, M. Lenglet a obtenu de belles cultures pures de bacilles de Ducrey, qu'il a présentées à la Société de Dermatologie. Il rapporte dans des observations les différentes expériences d'ensemencement et d'inoculation avec les cultures. Les résultats qu'il a obtenus ont toujours été positifs.

Quels sont les caractères d'une culture de bacilles de Ducrey? Leur aspect ne varie pas quelque soit le milieu auquel on emprunte le bacille (chancre, pus, bubon), et l'on voit à la surface des tubes ensemencés, apparaître au bout de 24 heures des colonies arrondies, brillantes, légèrement surélevées. Parfois au bout de 24 heures les colonies ne seront pas encore très apparentes, mais au bout de 48 heures le développement est complet et l'on voit alors des colonies opaques grisâtres de 1 à 2 m/m de

diamètre. Elles sont difficiles à prélever, et glissent sur la surface du milieu. L'élément constitutif de ces petits amas est un microbe absolument semblable à celui dont Ducrey a donné la description.

Si l'on examine les éléments développés dans le liquide condensé, on les trouve bien différents. Les bacilles sont plus petits, à extrémités moins arrondies, à espace clair peu net. Les chaînettes qu'ils constituent ont une longueur énorme, sont rectilignes ou affectant des courbes. C'est bien là toujours le même microbe prenant un mode de groupement particulier et une morphologie un peu différente. Mais si on reporte ces colonies sur la surface de sang gélosé, on voit le bacille donner de petites colonies arrondies.

Si on cultive sur sérum de lapin le bacille emprunté à un milieu quelconque, voici ce que l'on obtient : Le milieu se trouble à l'étuve et présente de petits flocons. Au microscope on voit des bacilles groupés en courtes chaînettes flexueuses et enchevêtrées formées quelquefois de quelques éléments seulement. Le bacille possède une zône centrale claire et deux extrémités ressemblant à des points, peu arrondies. Il donne en somme l'apparence d'un diplocoque. On pourra éviter cette erreur en le réensemençant.

Quelle est la vitalité de ce bacille? Le bacille de Ducrey peut se conserver longtemps pourvu que les cultures soient maintenues à l'étuve à 37°. On peut le repiquer avec succès au bout de trois semaines.

Le bacille de Ducrey a donc besoin pour pousser d'un milieu tout spécial ; aussi les différentes tentatives que nombre d'expérimentateurs avaient faites sur les milieux

usuels avaient-elles toujours échoué. La culture de ce bacille ne sera pas seulement une question fort intéressante au point de vue théorique ; elle peut recevoir une application pratique, et venir s'ajouter à la coloration de l'agent contagieux du chancre mou pour vérifier, en dernier ressort un diagnostic que par les seules données de la clinique on avait été obligé de laisser en suspens.

———

CONCLUSIONS

De cette étude sur le bacille du chancre mou il résulte que :

1° On retrouve dans tous les chancres mous un bacille semblable à celui que Ducrey a décrit en 1889 et qui est le bacille spécifique de cette lésion.

2° On peut par le procédé de coloration de Gram déceler ce microbe et le différencier d'avec les divers autres éléments microbiens qui l'accompagnent dans ces ulcérations,

3° Sa forme caractéristique permet de le distinguer des autres microbes. Court, aux extrémités arrondies, rétréci en son milieu, il a à peu près l'aspect d'une navette. Son mode de groupement en chaînettes ou en amas par couples ou par individus isolés, ne permettent pas de le confondre avec le bacille de la peau ou certains diplocoques.

4° Les récents essais de cultures semblent confirmer une fois de plus son identité et sa spécificité. — Elles ont été faites par MM. Bezançon, Griffon et Le Sourd sur gélose

au sang de lapin, et en sérum liquide de lapin, et par M. Lenglet sur un « milieu humanisé ».

5° Les caractères bien déterminés de ce bacille peuvent être d'une utilité incontestable pour diagnostiquer le chancre mou et surtout pour le différencier des ulcérations syphilitiques et des diverses ulcérations banales dues à d'autres microbes, dont le pronostic et le traitement sont différents.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

(1). *Leistikow.* — Annales de Dermatologie, 1884.

(2). *Straus.* — De la virulence du bubon qui accompagne le chancre mou. — Société de Biologie, 1884.

(3). *Ferrari.* — Sur la Pathogénie de l'Adénite chancreuse. — (Gaz. deg. Ospedali, juin 1885).

(3) *Ferrari.* — Le bacille du chancre mou (communication à l'Académie Gioncia, juillet 1885).

(4). *De Luca.* — Gaz. degli. Ospit., 1893.

(5). *Ducrey.* — Recherches expérimentales sur la nature du principe contagieux du chancre mou (Congrès international de Dermatologie et de Syphiligraphie, Paris 1889).

(6). *Krefting.* — Nordiskt medecinskt Arkir, 1891.

(7). *Jullien.* — Recherches expérimentales sur le chancre mou. Annales de Derm. et de Syph., avril 1892.

(8). *Unna.* — Communication faite par Pusey. Société de Dermatologie, 1892.

(9 .*Quinquand* et *Nicolle.* — Sur le microbe du chancre mou. Société de Dermat. et de Syph, 1892.

(10). *Krefting.* — Microbes spécifiques du chancre mou. Archiv. für Dermat. und. Syph., 1892.

(11). *Audry.* — Bactériologie du chancre simple. — Gaz. hebd. Paris, 1893.

(12). *Lasnet.* — Etude bactériologique du chancre mou et du bubon chancreux. Thèse de Bordeaux, 1894.



(13). *Ducrey.* — Noch. einige Worte uber das Wesen des einfachen. Monasth f. prakt. Dermat., 1892.

(14). *Lenglet.* — Culture du bacille Ducrey.Bulletin Médical 1898.

(14). *Lenglet.* — Culture du bacille de Ducrey. Annales Derm. et Syph., 1901.

(15). *Nicolle.* — Thèse, Paris, 1893.

(15). *Nicolle.* — Gazette Médicale de Paris, 1893.

(16). *Rivière.* — Gazette de Bordeaux, 1893.

(17). *Bezançon.* — Presse Médicale.

(17). *Petersen.* — Du chancre mou. Arch. f. Dermat., 1892.

(18). *Istamanoff* et *Akspiantz.* — Bactériologie du chancre mou. Société Médicale du Caucase, 1897.

(19). *Bezançon, Griffon* et *Le Sourd.*— Annales de Dermat. et Syph, 1901. Culture du bacille de Ducrey.

Cheinisse. — Annales Dermat. et Syph., 1894.

Colombini. — Giornale italian delle mar. vénér., 1894.

Colombini. — Gaz. degli. Ospitali, 1896.

Dubreuilh et *Lasnet.* — Arch. cliniques, Bordeaux, 1893.

Dubreuilh. — Arch. cliniques, Bordeaux, 1893.

Jullien. — Annales Dermat. et Syph., 1898.

ALBERT PERRELLON, IMPRIMEUR, LYON.

